

A projekt megvalósítása három területre koncentrált:

- I. Új elválasztó közegek bevezetése a királis kromatográfiába,
- II. Eddig még kellően el nem választott enantiomer párok megfelelő elválasztása,
- III. A környezetben előforduló enantiomer párok elválasztása.

I. Új elválasztó közegek bevezetése a királis kromatográfiába

A projekt ideje alatt egy új királis GC-s állófázis, a *transz*-ciklohexildiamidot tartalmazó szilikon blokkpolimer (ChDA) alkalmazására és az eredmények publikálására került sor. Az állófázis, a szokástól eltérően, főláncban tartalmazza a királis csoportot, amivel az egész molekula helikálissá vált elősegítve a királis felismerést. A ChDA kitűnőnek állófázisnak bizonyult, amit 34 enantiomer pár elválasztásával demonstráltunk. Az állófázis jól megtervezett összetételét mutatja, hogy magas hőfokon akár 4800 tányér/méter hatékonyság is elérhető. A fázis merev, csavart szerkezetű, gyűrűs, aromás vegyületek felé mutatja a legnagyobb szelektivitást, de alifás és aliciklikus enantiomerek elválasztása is megoldható segítségével. Számos esetben mértünk 1,05 fölötti alfa értékeket, amelyek az alapvonal elválasztást jóval meghaladó elválasztásokat biztosítottak. Ez az állófázis SFC alkalmazásokban is kitűnőnek bizonyult.

Az OTKA kutatások keretében a királis kapilláris elektroforézis gyakorlatába tíz új ciklodextrin származékot vezettünk be a Cyclolab kutatóival együttműködésben. Ezek az ágensek pozitív töltéssel rendelkeznek és egységesek voltak. A ciklodextrineket amino, aminohidroxil csoporttal és metil csoportokkal szubsztituáltuk. A molekulák pozitív töltése a semleges és negatív töltéssel rendelkező enantiomerek (piretroid savak, amino savak, kumarinok, nem-szteroid gyulladásgátlók és fenoxisav gyomirtók) elválasztásban előnyösek. A termékek egységessége (single isomer) az elválasztások jó reprodukálhatóságát biztosítja. A hidroxil csoportok metilizése a termékek nagy stabilitását eredményezte. Az egységes, stabil, jól reprodukálható pozitív töltéssel rendelkező királis szelektorokban a kapilláris elektroforézis hiányt szenvedett kutatásunkat megelőzően. Az ágensek hatékonyságát mutatja, hogy a királis elválasztások során 600000 tányér hatékonyságot tudtunk elérni 50 cm effektív úthosszon. Ezek az ágensek jóságát mutatja hogy a 6-monodeoxi-6-mono(3-hidroxil)propilamino- β -ciklodextrin 0,1 mM koncentrációban is 1,147 szelektivitási faktort eredményezett a környezeti szennyezésként is előforduló cisz deltametrin savra. Ugyanerre a vegyületre 1,2 értéknél nagyobb szelektivitási faktor és 12 értéket meghaladó elválasztási értéket is mértünk más ágensek magasabb szelektor koncentrációival. Nem volt ritka a tíz fölötti elválasztási érték kísérleteink alatt más, a környezetben előforduló királis savas szennyezőkre sem.

Eredményeink minőségét jól jelzi, hogy az Electrophoresis tudományos folyóirat két évente megjelenő királis elválasztásokkal foglalkozó különszámba többször is felkérést kaptunk cikkírássra.

A projekt ideje alatt, felkérésre összefoglaló tanulmányt is közöltünk a ciklodextrinek szerepéről a királis kromatográfiában a Trends in Analytical Chemistry folyóiratban.

II. Eddig még kellően el nem választott enantiomer párok megfelelő elválasztása

A projekt alatt számos újonnan szintetizált molekulának a rezolválását és királ szelektív analízisét sikerült megoldani. Ezek főleg az aril-alkil aminok és aril-alkilalkil alkoholok köréből kerültek ki. A királis benziloxi-1,2-propándiol zöld kémia szellemében, a környezetbarát szuperkritikus széndioxid alapú oldószerben végrehajtott enzimkatalizált enantiomer szelektív reakciójával és a reakciótermékek királis és akirális reakciójával is eredményesen foglalkozunk.

A nagyszámú molekula és a szisztematikusan végrehajtott analízis optimalizálások több általános érvényű következtetés levonását tette lehetővé.

Rendszert dolgoztunk ki az arilalkil-amin szubsztituált vegyületek pontos enantiomer arány meghatározására. Módszerünk megfelelő még abban az esetben is, ha a nyomnyi mennyiségben jelenlévő bármelyik izomer kevesebb mint 0,1%-ban van az elegyben. Ehhez szükség volt jó, legalább $R_s > 2,0$ elválasztásra és változtatható enantiomer elúciós sorrendre. A kis mennyiségben jelenlévő izomer elsőként elúciója esetén mérések pontossága sokkal jobb, mint a kis mennyiségben jelenlévő izomer másodikként elúciója esetén.

Az aril-alkil amin enantiomerek elúciós sorrendje megváltoztatható attól függően, hogy a vegyületek acetamid vagy trifluoroacetamid származékát analizáljuk ciklodextrin tartalmú GC-s állófázisokon. Azonban a trifluoro származékok felbontása esetenként (pl. feniletil-amin, metilamphetamin) nem elég a 99% enantiomer felesleg esetén. A megoldást a ChNEB naftil-etilamid királis részt tartalmazó szilikon állófázis, és a ChDA, ciklohexildiamid-királis részt tartalmazó szilikon állófázis váltakozó használata jelentette. A két fázison ugyanis az szubsztituált arilalkil-amin származékok enantiomerjei fordított retenciós sorrendben elúálódnak. A felhasznált állófázisok előzetes kutatásaink eredményei voltak, amelyeken a vizsgált enantiomereket már trifluoroacetamid alakban is $R_s > 2,0$ értékkel tudtuk elválasztani. A kísérletek során általános szabályként megállapítottuk azt is, hogy az aril-alkilamin vegyületek enantiomerjei nagyobb szelektivitással választhatók el acetamid származékuk alakjában, mint trifluoroacetyl származékként a következő állófázisokon: Chrasil-Dex, Cydex-B, TBDMSi, ChNEB és ChDA.

Az aril-alkil alkoholok enantiomerjeinél a szelektivitási sorrend acetil > szabad alkohol > trifluoroacetyl ciklodextrin alapú állófázisokon. Ezek az állófázisokon a szabad alkoholok enantiomerjei mutatattak fordított elúciós sorrendet az acil származékokhoz (acetil, trifluoroacetyl) képest.

A saját készítésű kémiaiilag kötött permetilezett β -ciklodextrin tartalmú Chrasil-Dex állófázis szelektivitása több esetben nem bizonyult elegendőnek (pl. benziloxi-1,2-propándiol, 1-naftil-1-etanol), ezért a jobb elválasztások érdekében 35% 2,3-dimetil-6-tercierbutil-dimetilszilil- β -ciklodextrin (TBDMSi) tartalmú szilikon mátrixszal rendelkező állófázist is készítettünk. Ezen az állófázison az irodalom több (pl. PCB 88, PCB 197, α -HCH, trans-chlordane) a környezetben előforduló királis szennyező elválasztását leírja. Az állófázis királis tartalma és a mátrix típusa a hatékonyság és a szelektivitás közti kompromisszum eredménye volt.

Az általunk készített oszlopokon, jobb elválasztásokat lehet elérni, mint a kereskedelmiéknél, de az eredményeink széleskörű hasznosítása igényli a kereskedelmi oszlopokon való végrehajthatóságot. Választásunk az SGE Cydex-B 0,25 oszlopra esett. Erre az oszlopra átvihető volt a Chrasil-Dex állófázison végrehajtott elválasztások több mint 80%-a. Néhány esetben (pl. krizantém sav, phenil-1-etilamin), azonban szignifikáns eltérést tapasztaltunk a két fázis szelektivitása között.

III. A környezetben előforduló enantiomer párok elválasztása

A kijelölt program szerint, királis állófázisok szelektivitását egyes környezeti szempontból fontos szennyező anyagokra kiemelkedő fontossággal vizsgáltuk. A méréseket *terc*-butil-dimetilszilil szubsztituált β -ciklodextrin (TBDMSi) tartalmú keverék, kémiaiilag kötött permetilezett β -ciklodextrin (Chrasil-Dex) és a kereskedelmi forgalomban kapható permetilezett β -ciklodextrin és szilikon polimer (Cydex-B, SGE) királis állófázisokkal végeztük. A különböző állófázisokon kapott eredmények összefoglalását az I. táblázat mutatja.

I. táblázat Néhány környezetben előforduló királis szennyező szelektivitási adatai különböző ciklodextrin tartalmú gázkromatográfiás állófázison mérve.

Vegyület	TBDMSi	Chrasil-Dex	Cydex-B
----------	--------	-------------	---------

	Analízis hőm. (°C)	Szelektivitás (α)	Analízis hőm. (°C)	Szelektivitás (α)	Analízis hőm. (°C)	Szelektivitás (α)
α -HCH	180	1,060	150	1,021	150	1,023
Diklórprop	180	1,049	160	1,012	160	1,024
Mekoprop	180	1,042	140	1,011	150	1,041
Silvex	160	1,024	115	1,031	160	1,010

A környezeti minták, csak olyan kis koncentrációban tartalmaztak minket érdeklő szennyezőket, hogy kimutatásuk csak GC-MS készülékkel, egyedi ion figyelő (SIM) üzemmódban volt lehetséges. Az előzetes GC-s vizsgálatok szerint a kiválasztott környezeti szennyezőkre legmegfelelőbbnek a TBDMSi állófázis mutatkozott. Azonban a rendelkezésünkre álló TBDMSi állófázissal nedvesített oszlopunk kis átmérőjű, ami nem volt jól illeszthető a nagyfelbontású GC-MS rendszerünkhöz. A fentiek miatt a kereskedelmi 0,25 mm belső átmérőjű Cydex-B-vel nedvesített oszlopot használtunk a környezeti minták GC-MS vizsgálatához.

A környezeti minták közül csak azokat vizsgáltuk, enantiomer arányra, amelyekről az előzetes akirális vizsgálatok során kiderült, hogy tartalmaznak királis szennyezőket. Magyarországról egy talajmintát vizsgáltunk meg enantiomer arányra, amely egy hulladéklerakóból származott (**Fűzfő**), és a hexaklór ciklohexán jelenlétét a screen vizsgálatok során felderítettük. A többi talajmintát lengyel kutatóktól kaptuk. A CUSTOM Soil Pesticides 01074 (**01074**) mintából vizsgáltuk az enantiomer arányokat α -HCH-ra és pentaklór-ciklohexánra (γ -**PCCH**) a hexaklór ciklohexánok degradációs metabolitjára is. Az Agroturon 5000 SC 15IV (**15IV**) mintából mértük a mekoprop és diklórprop enantiomer arányokat GC-MS módszerrel. A kapott eredményeket a II. táblázat mutatja. A rövidítések jelentése megtalálható a megelőző szövegben félkövér betűvel írva.

II. táblázat A vizsgált mintákban a kiválasztott ionokra tapasztalt enantiomer arányok

Minta jele	Vegyület	Mért ionok	Dúsult enantiomer	Enantiomer arány
Fűzfő	α -HCH	182,935 220,908	(-)	50,8 : 49,2
01074	α -HCH	182,935 220,908	(-)	50,7 : 49,3
01074	γ -PCCH	182,935 220,908	(-)	52,4 : 57,6
15IV	Mekoprop	248,001 249,998	(+)	53,7 : 46,3
15IV	Diklórprop	227,047 229,045	(+)	51,8 : 48,2

A II. táblázat adatai azt mutatják, hogy a talajban a csak kis mértékű a hexaklór ciklohexán vegyületek biológiai degradációja. Erre a (-) enantiomerek csekély feleslege utal. A γ -HCH degradációja főleg kémiai dehalogenáció lehet, amit a (-) γ -PCCH kis feleslege sugall. A mekoprop és a diklórprop (+) enantiomerjeinek feleslege mérsékeltövi száraz talajra jellemző degradációt mutat.

Mivel a Cydex-B királis állófázisokon nem kaptunk GC-MS készüléken is könnyen kiértékelhető elválást egyes klórozott peszticidekre, ezért megpróbáltuk elválasztásukat más állófázisokon is. A *tr*-ciklohexil-diamidot (ChDA) és naftil-etilamid (ChNEB) királis centrumot tartalmazó szilikon polimer királis állófázisokon végeztünk ezekkel a vegyületekkel méréseket. Ezeken a következő eredményeket kaptuk (III. táblázat):

III. táblázat Egyes klórozott peszticidek szelektivitása ChDA és ChNEB királis állófázisokon.

Vegyület	ChDA	ChNEB
----------	------	-------

	Analízis hőmérséklet (°C)	Szelektivitás (α)	Analízis hőmérséklet (°C)	Szelektivitás (α)
Heptaklór	160	1,017	110	1,02
Heptaklór epoxid	140	1,019	110	1,010
Klórdán	150	1,009	110	1,011

Mivel a szelektivitások ChNEB és a ChDA fázisokon nem adtak jobb eredményt mint a ciklodextrin alapú fázisok, lemondunk arról, hogy rendelkezésünkre álló oszlopokon ezeket a vegyületeket környezeti mintákban vizsgáljuk. Azonban elsőként mutattuk ki, hogy ezen vegyületek enantiomerjei nemcsak ciklodextrin alapú állófázisokon mutatnak szelektivitást GC-s körülmények között.

A királis vegyületek nemzetközi konferenciáján (17th International Symposium on Chiral Discrimination, Párma, Olaszország, 2005.09.11-14.) poszterelőadással (Chiral Separation of Pyrethroic Acids with Various Capillary Chromatographic Techniques Using Cyclodextrin Selectors) vettünk részt. A poszter témája jól egyezett a konferencia fő irányjaival, amik azt célozzák, hogy az enantiomer tiszta vegyszerekkel csökkenteni lehessen a környezet terhelését. A piretroidok királszelektív szempontjait több mint 10 előadás érintette. A kromatográfiai módszerek (GC vs. CE) változtatásával elért enantiomerek elúciós sorrendjének megfordítása nagy figyelmet váltottak ki.

A projekt ideje alatt (2003) a témavezető Juvancz Zoltán megvédte OTKA pályázat témájával nagyban átfedő akadémiai doktori értekezését. Kozma Dávid szintén a projekt témáját érintő akadémiai doktori értekezését beadta, aminek védésére 2006 márciusában kerül sor.

Összegezve elmondható, hogy az OTKA projekt célkitűzései legnagyobbbrészt teljesültek:

- Számos új királis elválasztó közeget vezettünk be a GC-s és CE gyakorlatba.
- Nagy számú újonnan szintetizált enantiomer pár analízisét oldottuk meg, vagy eredményesebb eljárást dolgoztunk ki a már elválasztott vegyületekre.
- A királis analízist bevezettük a magyar környezetvédelmi analitika fegyvertárába.
- Néhány általános érvényű törvényt ismertünk fel a királis vegyületek legmegfelelőbb származékképzésére, és az enantiomerek elúciós sorrendjének megfordítása.